

09.08.00

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

15/2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 8月 9日

REC'D 03 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第225102号

出 願 人
Applicant (s):

理化学研究所
科学技術振興事業団

JP00/05331

EJU

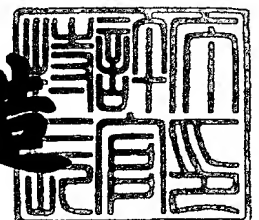
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3073420

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH11-020

【提出日】 平成11年 8月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 共重合ポリエステルの製造方法

【請求項の数】 12

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

 【氏名】 土肥 義治

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県朝霞市栄町 4 - 5 - 1 6 - 2 0 3

 【氏名】 松崎 弘美

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 共重合ポリエステルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体。

【請求項 2】 ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質

【請求項 3】 ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 4】 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質

【請求項 5】 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジেন্টな条件下でハ

イブリダイズし、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 6】 NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質

【請求項 7】 NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、請求項 1 記載の形質転換体。

(a) 配列番号 7 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 7 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項 8】 形質転換体がシュードモナス属又はラルストニア属に属する細菌である、請求項 1 記載の形質転換体。

【請求項 9】 シュードモナス属に属する細菌がシュードモナス・エスピー 61-3株(JCM10015)である請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とする共重合ポリエステルの製造方法。

【請求項 11】 ポリエステルが、炭素数 4 ～ 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなる請求項 10 記載の共重合ポリエステルの製造方法。

【請求項 12】 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットが、80～95%のモル分率で3-ヒドロキシブタン酸を含むものである請求項 11 記載の共重合ポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体及び該形質転換体による共重合ポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシブタン酸 (P(3HB)) を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する「グリーン」プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能な炭素資源から合成できる。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子であるために耐衝撃性に劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。しかし、鎖長の長い3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) ユニットとの共重合体を作製することで耐衝撃性が向上し、柔軟な材料となる。例えば、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) (旧名アルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*)) を用いて炭素源にグルコースとプロピオン酸を与えることで、炭素数5の3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) とのランダム共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HV)の合成が行われており、「Biopol」の商標で知られている [欧州特許出願第0052459号(1981)]。アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) による3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HH) との2成分共重合ポリエステル P(3HB-co-3HH) およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。P(3HB-co-3HH)共重合体は、3HHユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い糸や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている [Y. D

oi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)]。

【0003】

また、シュードモナス・エスピー61-3株 (*Pseudomonas* sp. JCM 10015)は、炭素数4～12といった幅広い3HAユニットを基質とすることができる、PhaC1 [特開平10-276781号公報、*J. Bacteriol.*, 180, 6459-6467, 1998] やPhaC2 [*J. Bacteriol.*, 180, 6459-6467, 1998] などのポリエステル重合酵素を有することが知られている。しかしながら、シュードモナス・エスピー61-3株によって生産される共重合ポリエステルは、3HB分率が低いために、合成された共重合ポリエステルはアモルファスとなりプラスチック材料としては好ましいものとはいえない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体及び該形質転換体を用いて3HB分率の高い共重合ポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されたシュードモナス・エスピー61-3株を、シュードモナス・エスピー61-3株由来ポリエステル重合酵素1遺伝子 (phaC1遺伝子)、ラルストニア・ユートロファ由来 β -ケトチオラーゼ遺伝子 (phbA遺伝子) およびラルストニア・ユートロファ由来NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子 (phbB遺伝子) を含む組換えベクターで形質転換した形質転換体が、炭素数4～12の3HAユニットを含む、3HBのモル分率が80～95%のP(3HB-co-3HA)を生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された宿主を、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含む組換えベクターで形質転換した形

質転換体である。

【 0 0 0 6 】

さらに、本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

- (a) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号 2 又は配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質

【 0 0 0 7 】

さらに、本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、前記形質転換体である。

- (a) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNA
- (b) 配列番号 1 又は配列番号 3 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA

【 0 0 0 8 】

さらに、本発明は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

- (a) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質

【 0 0 0 9 】

さらに、本発明は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、前記形質転換体である。

- (a) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNA
- (b) 配列番号 5 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【 0 0 1 0 】

さらに、本発明は、NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質

【 0 0 1 1 】

さらに、本発明は、NADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子が以下の(a)又は(b)のDNAからなる、前記形質転換体である。

(a) 配列番号 7 で表される塩基配列を含むDNA

(b) 配列番号 7 で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明は、形質転換体がシュードモナス属又はラルストニア属に属する細菌である前記形質転換体である。ここで、シュードモナス属に属する細菌としては、シュードモナス・エスピー61-3株が挙げれる。

さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からポリエステル(例えば、炭素数 4 ~ 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなるポリエステル)を採取することを特徴とする共重合ポリエステルの製造方法である。ここで、製造されるポリエステルとしては、炭素数 4 ~ 12 の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニット(例えば、3-ヒドロキシアルカン酸ユニットの 80 ~ 95 mol % が 3-ヒドロキシブタン酸)からなるポリエステルが挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

1. 形質転換用の宿主

形質転換に用いることができる宿主としては、組換えベクター中に含まれる各

遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・エスピー61-3株 (*Pseudomonas sp.* 61-3) などのシュードモナス属に属する細菌、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) などのラルストニア属に属する細菌、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などのバチルス (*Bacillus*) 属に属する細菌、大腸菌 (*Escherichia coli*) などのエッシェリヒア属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などのサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属に属する酵母、カンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) などのカンジダ (*Candida*) 属に属する酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【0014】

特に、所望の組成のポリエステルを宿主細胞に生産させるために、宿主細胞中に元来存在する特定のポリエステル重合酵素遺伝子を破壊した細胞を用いることもできる。図1には、ポリヒドロキシブタン酸 (P(3HB)) 及び3-ヒドロキシブタン酸と3-ヒドロキシアルカン酸との共重合物 (P(3HB-co-3HA)) の生成経路を示す。例えば、シュードモナス・エスピー61-3株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株は、構造遺伝子の末端欠失等により変異させたポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子を、シュードモナス・エスピー61-3株中に導入し、該変異ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子と染色体上のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子との間で相長的組換えを起こさせることにより構築することができる。ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されていることの確認は、該遺伝子の一部をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションによって、ハイブリダイズするバンドが、野生株由来のバンドに比べて予想される位置にシフトしていることを調べることによって行うことができる。

【0015】

2. 組換えベクター

本発明において用いられる組換えベクターは、ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を適当な発現ベクターに連結（挿入）することにより得ることができる。

ポリエステル重合酵素遺伝子としては、シュードモナス・エスピー61-3株由来

のphaC1遺伝子又はphaC2遺伝子などが挙げられる。phaC1遺伝子の塩基配列を配列番号1に、phaC1遺伝子がコードするポリエステル重合酵素のアミノ酸配列を配列番号2に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がポリエステル重合酵素活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列に1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2又は4で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号1又は3で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAがポリエステル重合酵素活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。ストリンジェントな条件とは、例えば、温度が60～68℃、好ましくは55～68℃であり、ナトリウム濃度が250～350mM、好ましくは300～400mMでの条件をいう。

【0016】

また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子としては、ラルストニア・ユートロファ由来のphbA遺伝子などが挙げられる。phbA遺伝子の塩基配列を配列番号5に、phbA遺伝子がコードする β -ケトチオラーゼのアミノ酸配列を配列番号6に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質が β -ケトチオラーゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号6で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号6で表されるアミノ酸配列に1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号6で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号5で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAが β -ケトチオラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。

ストリンジェントな条件とは、例えば、温度が60～68℃、好ましくは55～68℃であり、ナトリウム濃度が250～350mM、好ましくは300～400mMでの条件をいう。

【0017】

また、NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子としては、ラルストニア・ユートロファ由来のphbB遺伝子などが挙げられる。phbB遺伝子の塩基配列を配列番号7に、phbB遺伝子がコードするNADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼのアミノ酸配列を配列番号8に示すが、これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がNADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号8で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が欠失してもよく、又は配列番号8で表されるアミノ酸配列に1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号8で表されるアミノ酸配列の1個、好ましくは2～5個、さらに好ましくは5～10個のアミノ酸が置換してもよい。また、配列番号7で表される塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも、該DNAがNADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする限り本発明に用いることができる。ストリンジェントな条件とは、例えば、温度が60～68℃、好ましくは55～68℃であり、ナトリウム濃度が250～350mM、好ましくは300～400mMでの条件をいう。

【0018】

前記の各遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で自立複製可能なものであれば特に限定されず、プラスミドDNAやファージDNAをベクターとして用いることができる。

例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、pBR322、pUC18、pBluescript I等のプラスミドDNA、EMBL3、M13、λgt11等のファージDNA等を、酵母を宿主として用いる場合は、YEpl3、YCp50等を、動物細胞を宿主として用いる場合は、pcDNAI、pcDNAI/Amp（インビトロジェン社）等をベクターとして用いることができる。

【 0 0 1 9 】

また、ラルストニア属に属する細菌、シュードモナス属に属する細菌等を宿主として用いる場合には、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917(ATCC37355)やRSF1010複製起点を有するpJRD215(ATCC 37533)等をベクターとして用いることができる。

ベクターへの遺伝子の挿入は、上記遺伝子を含むDNA断片と、制限酵素消化されたベクターDNA断片とを、市販のDNAリガーゼを用いて連結反応させることにより行うことができる。ここで、上記遺伝子は、該遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに挿入されることが必要である。特に、遺伝子が発現されるためには、プロモーターの下流に遺伝子を挿入することが必要である。プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどを、酵母を宿主として用いる場合には、gal 1プロモーター、gal 10プロモーターなどを用いることができる。特に、シュードモナス属に属する細菌を宿主として用いる場合には、プロモーターとして、phaCl_{PS}遺伝子上流やphbCAB_{Re}オペロン上流のプロモーターを含むと考えられる領域などを用いることができる。なお、phaCl_{PS}遺伝子上流の塩基配列を配列番号9に、phbCAB_{Re}オペロン上流の塩基配列を配列番号10に示す。

【 0 0 2 0 】

また、本発明のベクターには、必要に応じて、ターミネーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられる。特に、シュードモナス属に属する細菌を宿主として用いる場合には、ターミネーターとして、phbCAB_{Re}オペロン下流のターミネーターを含むと考えられる領域などを用いることができる。なお、phbCAB_{Re}オペロン下流の塩基配列を配列番号11に示す。

【0021】

3. 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、上記2において得られた組換えベクターを上記1の宿主細胞中に導入することにより得ることができる。

細菌への組み換え体DNAの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 [Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.1頁, 1994年] やエレクトロポレーション法 [Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4 頁, 1994年] 等が挙げられる。また、シュードモナス属に属する細菌へのプラスミドの導入は、接合伝達法により行うことができる [Friedrich et al.: J. Bacteriol. 147:198-205(1981)]。

【0022】

酵母への組換え体DNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 [Methods.Enzymol.,194,182-187(1990)]、スフェロプラスト法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,1929-1933(1978)]、酢酸リチウム法 [J.Bacteriol.,153,163-168(1983)] 等が挙げられる。

動物細胞への組換え体DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【0023】

なお、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊されたシュードモナス・エスピー61-3株を、プラスミドpJBB49-phbで形質転換した株 (Pseudomonas sp. BB49) はFERM P-17503として、プラスミドpJKSc46-phaで形質転換した株 (Pseudomonas sp. KSc46) はFERM P-17504として、およびpJKSc54-phabで形質転換した株 (Pseudomonas sp. KSc54) はFERM P-17505として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成11年8月5日付で寄託されている。

【0024】

4. ポリエステルの製造

ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に共重合ポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリ

エステルを採取することにより行われる。

本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0025】

ラルストニア属に属する細菌やシュードモナス属に属する細菌等を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源のいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01~0.1%に制限した培地が挙げられる。また、培養温度は25~37℃の範囲で好氣的に2~7日培養することによりポリエステルを菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルを回収する。

【0026】

炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数4以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数4以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

【0027】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0028】

培養は、通常振盪培養などの好氣的条件下、25~37℃で発現誘導後24時間以上行う。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質

を培地に添加してもよい。

誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、インドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加することができる。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば RPMI-1640、DMEM 培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常 5% CO₂ 存在下、30~37℃ で 14~28 日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0029】

本発明において、ポリエステルの精製は、例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルを得る。得られたポリエステルは、生分解性の糸やフィルム、各種容器の材料として利用することができる。

得られたポリエステルが目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により行う。

【0030】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

〔実施例 1〕 シュードモナス・エスピー 61-3 株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株の構築

シュードモナス・エスピー 61-3 株 (*Pseudomonas* sp. JCM 10015) は、炭素数 4~12 の幅広い基質を利用できるポリヒドロキシアルカン酸合成酵素 (PhaC1 及び PhaC2) に加えて、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素 (PhbC) を保有するため、この菌株は、3-ヒドロキシブタン酸を唯一のユニットとするポリエステル (P(3HB)) と

、炭素数 4 ～12 の 3HA ユニットが取り込まれた共重合ポリエステル (P(3HB-co-3HA)) とのブレンド体を合成する。3HB ユニットは、PhaC1 や PhaC2 よりも該ユニットとの親和性が高い PhbC の、基質として優先的に利用されやすく、そのため、3HB 分率の高い共重合ポリエステルは合成されない。そこで、シュードモナス・エスピー 61-3 株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊株の構築を行った。

【 0 0 3 1 】

すなわち、まずシュードモナス・エスピー 61-3 株のポリヒドロキシブタン酸合成酵素をコードする遺伝子 (phbC_{PS} 遺伝子) の 5' 末端を 342bp 及び 3' 末端を 418bp を欠失させることにより、941bp の欠失型ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子断片 (EcoRI-PstI 断片) を作製した。次いで、得られた EcoRI-PstI 断片を、pBR322 の EcoRI、PstI 部位に連結し、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子破壊用のプラスミド pBREP9(Tc^r) を作製した。得られたプラスミド pBREP9(Tc^r) を、272mM のショ糖を含む 8mM HEPES 緩衝液 (pH7.2) 中に懸濁したシュードモナス・エスピー 61-3 株にエレクトロポレーション (条件 : 7.5kV/cm、800Ω、25μF) により導入した。phbC_{PS} 遺伝子破壊株 (phbC::tet) は、テトラサクリン含有 LB 培地上で生育できる株をスクリーニングし、いくつかのスクリーニング株及び野性株から調製した染色体 DNA を適当な制限酵素で消化後、phbC_{PS} 遺伝子の一部をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを行って、予測される分子量の位置にシフトしたバンドを形成する株を選択することによって得た。

【 0 0 3 2 】

〔実施例 2〕組換えベクターの作製

組換えベクターの作製手順を図 2 に示した。DNA 断片の切断及び連結等は常法 [Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989] に従って行った。図 2 に記載のように、pBS EX22 及び pGEM'-phbCAB を出発プラスミドとして用いた。ここで、pBSEX22 は、シュードモナス・エスピー 61-3 株の phaC1 遺伝子を含む 2.2-kb EcoRI-XbaI 領域を pBluescript II KS+ に挿入することにより作製し、pGEM'-phbCAB は、ラルストニア・ユートロファ H16 (ATCC 17699) の phbCAB 遺伝子 [J. Biol. Chem., 264, 15293-15297, 1989; J. Biol. Chem., 264, 15298-15303, 1989] を PCR で増幅し、得ら

れたPCR断片を、NdeIとPstI部位を破壊したpGEM-T (Promega社) ベクターに挿入することにより作製した。

【0033】

シュードモナス・エスピー61-3株中で複製可能な形態にするために、組換えベクター構築の最後の工程において、目的の遺伝子をコードするDNA断片を、シュードモナス・エスピー61-3株中で複製可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入・連結した。すなわち、プラスミドpJASc22は、pBSEX22から、シュードモナス・エスピー61-3株由来ポリエステル重合酵素1遺伝子($phaC1_{PS}$ 遺伝子)及び該遺伝子のプロモーター(P_{PS} プロモーター)を含むApaI-SacI断片を切り出し、該断片を、pJRD215のApaI、SacI部位に連結・挿入することにより作製した。また、プラスミドpJBB49-phbは、ラルストニア・ユートロファ由来 $phbCAB_{Re}$ オペロンプロモーター(P_{Re} プロモーター)、 $phaC1_{PS}$ 遺伝子、ラルストニア・ユートロファ由来 β -ケトチオラーゼ遺伝子($phbA_{Re}$ 遺伝子)、ラルストニア・ユートロファ由来NADPH-アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子($phbB_{Re}$ 遺伝子)及びラルストニア・ユートロファ由来 $phbCAB_{Re}$ オペロンターミネーター(T_{Re} ターミネーター)を含むBamHI-BamHI断片を、pJRD215のBamHI部位に連結・挿入することにより作製した。そして、プラスミドpJKSc46-phaは、 P_{PS} プロモーター、 $phaC1_{PS}$ 遺伝子、 $phbA_{Re}$ 遺伝子、 $phbB_{Re}$ 遺伝子及び T_{Re} ターミネーターを含むKpnI-SacI断片を、pJRD215のKpnI、SacI部位に連結・挿入することにより作製した。さらに、プラスミドpJKSc54-phabは、 P_{PS} プロモーター、 $phaC1_{PS}$ 遺伝子、 P_{Re} プロモーター、 $phbA_{Re}$ 遺伝子、 $phbB_{Re}$ 遺伝子及び T_{Re} ターミネーターを含むKpnI-SacI断片を、pJRD215のKpnI、SacI部位に連結・挿入することにより作製した。このようにて得られた4種類のプラスミドの構造を図3に示した。

【0034】

〔実施例3〕シュードモナス・エスピー61-3株($phbC::tet$)形質転換体の作製

実施例1において得られたシュードモナス・エスピー61-3株の $phbC_{PS}$ 遺伝子破壊株($phbC::tet$)に、実施例2において得られたプラスミドを、接合伝達法により導入して形質転換体を作製した。すなわち、まず4種類のプラスミドpJASc22、pJBB49-phb、pJKSc46-pha、pJKSc54-phabをそれぞれ大腸菌S17-1株に塩化カ

ルシウム法によって形質転換した。次いで得られた形質転換体及びシュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)株をそれぞれLB培地1.5ml中で、30℃で一晩培養した。次に、大腸菌の培養物0.1ml及びシュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)株の培養物0.1mlを混合し、30℃で4時間培養した。そして、菌体混合液をMS寒天培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、2%グルコース、0.1%(v/v) Trace element solution (CoCl₂·6H₂O 0.218g、FeCl₃ 9.7g、CaCl₂ 7.8g、NiCl₃·6H₂O 0.118g、CrCl₃·6H₂O 0.105g、CuSO₄·5H₂O 0.156gを0.1N塩酸1 literに溶解したもの)、1.5%寒天、50 mg/lカナマイシン、12.5mg/lテトラサイクリン)に塗布し、30℃で2～5日間培養した。

MS寒天培地上で増殖したコロニーを単離することによって形質転換体を得た。pJASc22、pJBB49-phb、pJKSc46-pha、および、pJKSc54-phabを有する形質転換体をそれぞれ、シュードモナス・エスピーASc22株、BB49株、KSc46株、および、KSc54株と命名した。

【0035】

〔実施例4〕シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)形質転換体によるポリエステル合成

実施例3において得られた形質転換体を用いてポリエステル生産を行った。すなわち、シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)株、ASc22株、BB49株、KSc46株、KSc54株を、それぞれ、2%グルコースを含む100mlのMS培地に植菌し、坂口フラスコ中、28℃で48時間培養した。遠心分離によって菌体を回収し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量、ポリエステル含量、ポリエステル組成を測定した。

【0036】

すなわち、乾燥菌体10～30mgに2mlの硫酸-メタノール混液(15:85)と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガスクロマトグ

ラフは島津製作所製GC-14A、キャピラリーカラムはG Lサイエンス社製NEUTRA BOND-1（カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4 μ m）を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1に示した。

【0037】

【表1】

シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)における共重合ポリエステルの生産

菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル 含量(重量%)	ポリエステル組成 (mol%)					
			3HB (C ₄)	3HHx (C ₆)	3HO (C ₈)	3HD (C ₁₀)	3HDD (C ₁₂)	3H5DD (C ₁₂)
phbC::tet	0.7	4	36	0	6	23	20	15
Asc22	0.7	6	64	0	2	15	11	8
BB49	1.7	38	92	0	1	4	2	1
Ksc46	2.6	37	81	0	1	9	5	4
Ksc54	2.5	45	92	0	1	3	3	1

注) 3HB: 3-ヒドロキシブタン酸; 3HHx: 3-ヒドロキシヘキサン酸; 3HO: 3-ヒドロキシオクタン酸;
3HD: 3-ヒドロキシデカン酸; 3HDD: 3-ヒドロキシドデカン酸; 3H5DD: 3-ヒドロキシ-cis-5-ドデカン酸

【0038】

表1からも明らかのように、各組換え菌は、2%グルコースを炭素源として5～50重量%程度のポリエステルを比較的効率的に蓄積した。シュードモナス・エスピー61-3株(phbC::tet)によって生産されたポリエステルは、3HB分率が36mol%からなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HA)であった。これに対し、phaC1遺伝子が導入されたASc22株によって生産されたポリエステルは、3HB分率が前記ポリエステルに比べわずかに増加し、約64mol%であった。一方、ラルストニア・ユートロファ由来のphbA遺伝子及びphbB遺伝子が導入されたBB49株、KSc46株、KSc54株によって生産されたポリエステルは、81～92mol%と高い3HB分率を有していた。また、これらの株におけるポリエステルの菌体内蓄積率は、37～45重量%と高い値を示した。一般に、高3HB分率の共重合ポリエステルP(3HB-co-3HA)は、P(3HB)とは異なり、柔軟性を有すると共に耐衝撃性に優れている。上記菌株を用いることにより、より高い効率で、より実用的な生分解性プラスチックを製造できることが分かった。

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

本発明の製造方法は、炭素数 4 ～12 の 3 - ヒドロキシアルカン酸ユニットからなり、特に 3HB 分率の高い共重合ポリエステル、P(3HB-co-3HA) を合成することである。このようなポリエステルは、熱安定性や成形性に優れており、P(3HB) に比べて耐衝撃性に優れた生分解性プラスチックとなる点で有用である。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Research ; Japan Science and Technology Corporetion

<120> The method of production of copolymerized polyester

<130> RJH11-020

<160> 11

<210> 1

<211> 1680

<212> DNA

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1677)

<400> 1

atg agt aac aag aat agc gat gac ttg aat cgt caa gcc tcg gaa aac 48

Met Ser Asn Lys Asn Ser Asp Asp Leu Asn Arg Gln Ala Ser Glu Asn

1

5

10

15

acc ttg ggg ctt aac cct gtc atc ggc ctg cgt gga aaa gat ctg ctg	96
Thr Leu Gly Leu Asn Pro Val Ile Gly Leu Arg Gly Lys Asp Leu Leu	
20 25 30	
act tct gcc cga atg gtt tta acc caa gcc atc aaa caa ccc att cac	144
Thr Ser Ala Arg Met Val Leu Thr Gln Ala Ile Lys Gln Pro Ile His	
35 40 45	
agc gtc aag cac gtc gcg cat ttt ggc atc gag ctg aag aac gtg atg	192
Ser Val Lys His Val Ala His Phe Gly Ile Glu Leu Lys Asn Val Met	
50 55 60	
ttt ggc aaa tcg aag ctg caa ccg gaa agc gat gac cgt cgt ttc aac	240
Phe Gly Lys Ser Lys Leu Gln Pro Glu Ser Asp Asp Arg Arg Phe Asn	
65 70 75 80	
gac ccc gcc tgg agt cag aac cca ctc tac aaa cgt tat cta caa acc	288
Asp Pro Ala Trp Ser Gln Asn Pro Leu Tyr Lys Arg Tyr Leu Gln Thr	
85 90 95	
tac ctg gcg tgg cgc aag gaa ctc cac gac tgg atc ggc aac agc aaa	336
Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu His Asp Trp Ile Gly Asn Ser Lys	
100 105 110	
ctg tcc gaa cag gac atc aat cgc gct cac ttc gtg atc acc ctg atg	384
Leu Ser Glu Gln Asp Ile Asn Arg Ala His Phe Val Ile Thr Leu Met	
115 120 125	
acc gaa gcc atg gcc ccg acc aac agt gcg gcc aat ccg gcg gcg gtc	432
Thr Glu Ala Met Ala Pro Thr Asn Ser Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val	
130 135 140	
aaa cgc ttc ttc gaa acc ggc ggt aaa agc ctg ctc gac ggc ctc aca	480
Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Thr	
145 150 155 160	
cat ctg gcc aag gac ctg gta aac aac ggc ggc atg ccg agc cag gtg	528
His Leu Ala Lys Asp Leu Val Asn Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val	

165	170	175	
gac atg ggc gct ttc gaa gtc ggc aag agt ctg ggg acg act gaa ggt			576
Asp Met Gly Ala Phe Glu Val Gly Lys Ser Leu Gly Thr Thr Glu Gly			
180	185	190	
gca gtg gtt ttc cgc aac gac gtc ctc gaa ttg atc cag tac cgg ccg			624
Ala Val Val Phe Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Arg Pro			
195	200	205	
acc acc gaa cag gtg cat gag cga ccg ctg ctg gtg gtc cca ccg cag			672
Thr Thr Glu Gln Val His Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln			
210	215	220	
atc aac aag ttt tat gtg ttt gac ctg agc ccg gat aaa agc ctg gcg			720
Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Asp Lys Ser Leu Ala			
225	230	235	240
cgc ttc tgc ctg agc aac aac cag caa acc ttt atc gtc agc tgg cgc			768
Arg Phe Cys Leu Ser Asn Asn Gln Gln Thr Phe Ile Val Ser Trp Arg			
245	250	255	
aac ccg acc aag gcc cag cgt gag tgg ggt ctg tcg act tac atc gat			816
Asn Pro Thr Lys Ala Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Asp			
260	265	270	
gcg ctc aaa gaa gcc gtc gac gta gtt tcc gcc atc acc ggc agc aaa			864
Ala Leu Lys Glu Ala Val Asp Val Val Ser Ala Ile Thr Gly Ser Lys			
275	280	285	
gac atc aac atg ctc ggc gcc tgc tcc ggt ggc att acc tgc acc gcg			912
Asp Ile Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala			
290	295	300	
ctg ctg ggt cac tac gcc gct ctc ggc gag aag aag gtc aat gcc ctg			960
Leu Leu Gly His Tyr Ala Ala Leu Gly Glu Lys Lys Val Asn Ala Leu			
305	310	315	320
acc ctt ttg gtc agc gtg ctc gac acc acc ctc gac tcc cag gtt gca			1008

Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Leu Asp Ser Gln Val Ala	
325	330 335
ctg ttc gtc gat gag aaa acc ctg gaa gct gcc aag cgt cac tcg tat	1056
Leu Phe Val Asp Glu Lys Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr	
340	345 350
cag gcc ggc gtg ctg gaa ggc cgc gac atg gcc aaa gtc ttc gcc tgg	1104
Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Val Phe Ala Trp	
355	360 365
atg cgc cct aac gac ctg atc tgg aac tac tgg gtc aac aac tac ctg	1152
Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu	
370	375 380
ctg ggt aac gag cca ccg gtc ttc gac att ctt ttc tgg aac aac gac	1200
Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp	
385	390 395 400
acc acc cgg ttg cct gct gcg ttc cac ggc gat ctg atc gaa atg ttc	1248
Thr Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Ile Glu Met Phe	
405	410 415
aaa aat aac cca ctg gtg cgc gcc aat gca ctc gaa gtg agc ggc acg	1296
Lys Asn Asn Pro Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Glu Val Ser Gly Thr	
420	425 430
ccg atc gac ctc aaa cag gtc act gcc gac atc tac tcc ctg gcc ggc	1344
Pro Ile Asp Leu Lys Gln Val Thr Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly	
435	440 445
acc aac gat cac atc acg ccc tgg aag tct tgc tac aag tcg gcg caa	1392
Thr Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Lys Ser Cys Tyr Lys Ser Ala Gln	
450	455 460
ctg ttc ggt ggc aag gtc gaa ttc gtg ctg tcc agc agt ggg cat atc	1440
Leu Phe Gly Gly Lys Val Glu Phe Val Leu Ser Ser Ser Gly His Ile	
465	470 475 480

cag agc att ctg aac ccg ccg ggc aat ccg aaa tca cgt tac atg acc 1488
 Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ser Arg Tyr Met Thr
 485 490 495
 agc acc gac atg cca gcc acc gcc aac gag tgg caa gaa aac tca acc 1536
 Ser Thr Asp Met Pro Ala Thr Ala Asn Glu Trp Gln Glu Asn Ser Thr
 500 505 510
 aag cac acc gac tcc tgg tgg ctg cac tgg cag gcc tgg cag gcc gag 1584
 Lys His Thr Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ala Trp Gln Ala Glu
 515 520 525
 cgc tcg ggc aaa ctg aaa aag tcc ccg acc agc ctg ggc aac aag gcc 1632
 Arg Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Gly Asn Lys Ala
 530 535 540
 tat ccg tca gga gaa gcc gcg ccg ggc acg tat gtg cat gaa cgt taa 1680
 Tyr Pro Ser Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
 545 550 555

<210> 2

<211> 559

<212> PRT

<213> *Pseudomonas* sp. strain 61-3

<400> 2

Met Ser Asn Lys Asn Ser Asp Asp Leu Asn Arg Gln Ala Ser Glu Asn
 1 5 10 15
 Thr Leu Gly Leu Asn Pro Val Ile Gly Leu Arg Gly Lys Asp Leu Leu
 20 25 30
 Thr Ser Ala Arg Met Val Leu Thr Gln Ala Ile Lys Gln Pro Ile His
 35 40 45
 Ser Val Lys His Val Ala His Phe Gly Ile Glu Leu Lys Asn Val Met

50	55	60
Phe Gly Lys Ser Lys Leu Gln Pro Glu Ser Asp Asp Arg Arg Phe Asn		
65	70	75
Asp Pro Ala Trp Ser Gln Asn Pro Leu Tyr Lys Arg Tyr Leu Gln Thr		80
	85	90
Tyr Leu Ala Trp Arg Lys Glu Leu His Asp Trp Ile Gly Asn Ser Lys		95
	100	105
Leu Ser Glu Gln Asp Ile Asn Arg Ala His Phe Val Ile Thr Leu Met		110
	115	120
Thr Glu Ala Met Ala Pro Thr Asn Ser Ala Ala Asn Pro Ala Ala Val		125
	130	135
Lys Arg Phe Phe Glu Thr Gly Gly Lys Ser Leu Leu Asp Gly Leu Thr		140
145	150	155
His Leu Ala Lys Asp Leu Val Asn Asn Gly Gly Met Pro Ser Gln Val		160
	165	170
Asp Met Gly Ala Phe Glu Val Gly Lys Ser Leu Gly Thr Thr Glu Gly		175
	180	185
Ala Val Val Phe Arg Asn Asp Val Leu Glu Leu Ile Gln Tyr Arg Pro		190
	195	200
Thr Thr Glu Gln Val His Glu Arg Pro Leu Leu Val Val Pro Pro Gln		205
	210	215
Ile Asn Lys Phe Tyr Val Phe Asp Leu Ser Pro Asp Lys Ser Leu Ala		220
225	230	235
Arg Phe Cys Leu Ser Asn Asn Gln Gln Thr Phe Ile Val Ser Trp Arg		240
	245	250
Asn Pro Thr Lys Ala Gln Arg Glu Trp Gly Leu Ser Thr Tyr Ile Asp		255
	260	265
Ala Leu Lys Glu Ala Val Asp Val Val Ser Ala Ile Thr Gly Ser Lys		270
	275	280
		285

Asp Ile Asn Met Leu Gly Ala Cys Ser Gly Gly Ile Thr Cys Thr Ala
 290 295 300
 Leu Leu Gly His Tyr Ala Ala Leu Gly Glu Lys Lys Val Asn Ala Leu
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Val Ser Val Leu Asp Thr Thr Leu Asp Ser Gln Val Ala
 325 330 335
 Leu Phe Val Asp Glu Lys Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser Tyr
 340 345 350
 Gln Ala Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Val Phe Ala Trp
 355 360 365
 Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr Leu
 370 375 380
 Leu Gly Asn Glu Pro Pro Val Phe Asp Ile Leu Phe Trp Asn Asn Asp
 385 390 395 400
 Thr Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Ile Glu Met Phe
 405 410 415
 Lys Asn Asn Pro Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Glu Val Ser Gly Thr
 420 425 430
 Pro Ile Asp Leu Lys Gln Val Thr Ala Asp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly
 435 440 445
 Thr Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Lys Ser Cys Tyr Lys Ser Ala Gln
 450 455 460
 Leu Phe Gly Gly Lys Val Glu Phe Val Leu Ser Ser Ser Gly His Ile
 465 470 475 480
 Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Gly Asn Pro Lys Ser Arg Tyr Met Thr
 485 490 495
 Ser Thr Asp Met Pro Ala Thr Ala Asn Glu Trp Gln Glu Asn Ser Thr
 500 505 510
 Lys His Thr Asp Ser Trp Trp Leu His Trp Gln Ala Trp Gln Ala Glu

515 520 525
 Arg Ser Gly Lys Leu Lys Lys Ser Pro Thr Ser Leu Gly Asn Lys Ala
 530 535 540
 Tyr Pro Ser Gly Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val His Glu Arg
 545 550 555

<210> 3

<211> 1683

<212> DNA

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1680)

<400> 3

atg aga gag aaa cca acg ccg ggc ttg ctg ccc aca ccc gcg acg ttc	48
Met Arg Glu Lys Pro Thr Pro Gly Leu Leu Pro Thr Pro Ala Thr Phe	
1 5 10 15	
atc aac gct cag agt gcg att acc ggt ctg cgc ggc cgg gat ctg ttc	96
Ile Asn Ala Gln Ser Ala Ile Thr Gly Leu Arg Gly Arg Asp Leu Phe	
20 25 30	
tcg acc ctg cgc agc gtg gcc gcc cac ggc ctg cgt cac ccg gtg cgc	144
Ser Thr Leu Arg Ser Val Ala Ala His Gly Leu Arg His Pro Val Arg	
35 40 45	
agc gcc cgt cat gtt ctg gca ctg ggc ggc cag ttg ggc cgc gtg ctg	192
Ser Ala Arg His Val Leu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Gly Arg Val Leu	
50 55 60	
ctg ggc gaa acg ctg cac acg ccg aac ccg aaa gac aat cgc ttt gcg	240

Leu Gly Glu Thr	Leu His Thr Pro Asn Pro Lys Asp Asn Arg Phe Ala	
65	70	75
gac ccg acc tgg aga ctg aat ccg ttt tac cgg cgc agc ctg cag gcc		288
Asp Pro Thr Trp Arg Leu Asn Pro Phe Tyr Arg Arg Ser Leu Gln Ala		
	85	90
tat ctg agc tgg cag aaa cag gtc aaa agc tgg atc gat gaa agc ggc		336
Tyr Leu Ser Trp Gln Lys Gln Val Lys Ser Trp Ile Asp Glu Ser Gly		
	100	110
atg agt gac gat gac cgc gcc cgc gcg cat ttc gtc ttc gca ctg ctc		384
Met Ser Asp Asp Asp Arg Ala Arg Ala His Phe Val Phe Ala Leu Leu		
	115	125
aat gac gcc gtg tcc ccc tcc aat acc ctg ctc aac ccg cta gcg atc		432
Asn Asp Ala Val Ser Pro Ser Asn Thr Leu Leu Asn Pro Leu Ala Ile		
	130	140
aag gag ctg ttc aac tcc ggt ggc aac agc ctg gtc cgc ggt ctc agc		480
Lys Glu Leu Phe Asn Ser Gly Gly Asn Ser Leu Val Arg Gly Leu Ser		
145	150	160
cat tta ttc gac gac ctg atg cac aac aac ggg ctg ccc agt cag gtc		528
His Leu Phe Asp Asp Leu Met His Asn Asn Gly Leu Pro Ser Gln Val		
	165	175
acc aaa cac gcc ttc gag att ggc aag acc gtg gca acc acc gcc ggg		576
Thr Lys His Ala Phe Glu Ile Gly Lys Thr Val Ala Thr Thr Ala Gly		
	180	190
tcc gtg gtg ttt cgc aac gag ctg ctc gag ctg atg cag tac aag ccg		624
Ser Val Val Phe Arg Asn Glu Leu Leu Glu Leu Met Gln Tyr Lys Pro		
	195	205
atg agc gaa aaa cag tac gcc aag ccg ttg ctg atc gtc ccg ccg cag		672
Met Ser Glu Lys Gln Tyr Ala Lys Pro Leu Leu Ile Val Pro Pro Gln		
	210	220

att aac aag tac tac att ttc gac ctc agc ccg ggt aac agc ttc gtc	720
Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Leu Ser Pro Gly Asn Ser Phe Val	
225 230 235 240	
cag tac gca ttg aag aat ggt ctg cag gtg ttc gtg gtc agc tgg cgt	768
Gln Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Leu Gln Val Phe Val Val Ser Trp Arg	
245 250 255	
aac ccg gat gtt cgc cac cgc gaa tgg ggc ctg tcc agt tac gtt gag	816
Asn Pro Asp Val Arg His Arg Glu Trp Gly Leu Ser Ser Tyr Val Glu	
260 265 270	
gca ctg gaa gaa gca ctg aat gtt tgc cgc gct atc acc ggc gcg cgc	864
Ala Leu Glu Glu Ala Leu Asn Val Cys Arg Ala Ile Thr Gly Ala Arg	
275 280 285	
gac gtc aat ctg atg ggc gcc tgt gct ggc ggc ctg acc atc gcg gct	912
Asp Val Asn Leu Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala	
290 295 300	
ctg caa ggt cat ctg caa gcc aag cgg caa ctg cgg cgg gtc tcc agc	960
Leu Gln Gly His Leu Gln Ala Lys Arg Gln Leu Arg Arg Val Ser Ser	
305 310 315 320	
gcc agc tac ctg gtc agc ctg ctg gat agc cag ata gac agc ccg gcg	1008
Ala Ser Tyr Leu Val Ser Leu Leu Asp Ser Gln Ile Asp Ser Pro Ala	
325 330 335	
acg ttg ttc gcc gat gag cag acg ctg gaa gcc gcc aag cgc cat tcc	1056
Thr Leu Phe Ala Asp Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser	
340 345 350	
tat caa cga ggt gtg ctc gag ggg cgc gac atg gcg aaa atc ttc gcc	1104
Tyr Gln Arg Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Ile Phe Ala	
355 360 365	
tgg atg cgc ccc aat gac ctg atc tgg aac tac tgg gtc aac aac tac	1152
Trp Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr	

370	375	380	
ctg ctg ggc aaa gaa ccg ccg gcc ttc gac att ctg tat tgg aac agt			1200
Leu Leu Gly Lys Glu Pro Pro Ala Phe Asp Ile Leu Tyr Trp Asn Ser			
385	390	395	400
gac aac acg cgc ctg cca gcg gca ttc cat ggc gac ctg ctg gac ttc			1248
Asp Asn Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Leu Asp Phe			
405	410	415	
ttc aag cac aat ccg ctg act cac ccc ggc ggg ctg gag gtc tgt ggc			1296
Phe Lys His Asn Pro Leu Thr His Pro Gly Gly Leu Glu Val Cys Gly			
420	425	430	
acg cct atc gat ttg cag aag gtc aac gta gac agc ttc agc gtg gcc			1344
Thr Pro Ile Asp Leu Gln Lys Val Asn Val Asp Ser Phe Ser Val Ala			
435	440	445	
ggc atc aac gac cac atc act ccg tgg gac gcg gtg tac cgc tcg acc			1392
Gly Ile Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Asp Ala Val Tyr Arg Ser Thr			
450	455	460	
ctg ctg ctg ggt ggc gac cgg cgc ttc gta ctg tcc aac agc ggg cat			1440
Leu Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Phe Val Leu Ser Asn Ser Gly His			
465	470	475	480
atc cag agc atc ctc aac ccg ccg agc aac ccc aag tcc aac tac atc			1488
Ile Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Ser Asn Pro Lys Ser Asn Tyr Ile			
485	490	495	
gag aac ccc aag ctc agt ggc gat cca cgc gcc tgg tat tac gac ggc			1536
Glu Asn Pro Lys Leu Ser Gly Asp Pro Arg Ala Trp Tyr Tyr Asp Gly			
500	505	510	
acc cat gtc gaa ggt agc tgg tgg cca cgt tgg ctg agc tgg att cag			1584
Thr His Val Glu Gly Ser Trp Trp Pro Arg Trp Leu Ser Trp Ile Gln			
515	520	525	
gag cgc tcc ggt acc caa cgc gaa acc ctg atg gcc ctt ggt aac cag			1632

Glu Arg Ser Gly Thr Gln Arg Glu Thr Leu Met Ala Leu Gly Asn Gln
 530 535 540
 aac tat cca ccg atg gag gcg gcg cca ggt acc tac gtg cgc gtg cgc 1680
 Asn Tyr Pro Pro Met Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val Arg Val Arg
 545 550 555 560
 tga 1683

<210> 4

<211> 560

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp. strain 61-3

<400> 4

Met Arg Glu Lys Pro Thr Pro Gly Leu Leu Pro Thr Pro Ala Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Asn Ala Gln Ser Ala Ile Thr Gly Leu Arg Gly Arg Asp Leu Phe
 20 25 30
 Ser Thr Leu Arg Ser Val Ala Ala His Gly Leu Arg His Pro Val Arg
 35 40 45
 Ser Ala Arg His Val Leu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Gly Arg Val Leu
 50 55 60
 Leu Gly Glu Thr Leu His Thr Pro Asn Pro Lys Asp Asn Arg Phe Ala
 65 70 75 80
 Asp Pro Thr Trp Arg Leu Asn Pro Phe Tyr Arg Arg Ser Leu Gln Ala
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Trp Gln Lys Gln Val Lys Ser Trp Ile Asp Glu Ser Gly
 100 105 110
 Met Ser Asp Asp Asp Arg Ala Arg Ala His Phe Val Phe Ala Leu Leu
 115 120 125

Asn Asp Ala Val Ser Pro Ser Asn Thr Leu Leu Asn Pro Leu Ala Ile
 130 135 140
 Lys Glu Leu Phe Asn Ser Gly Gly Asn Ser Leu Val Arg Gly Leu Ser
 145 150 155 160
 His Leu Phe Asp Asp Leu Met His Asn Asn Gly Leu Pro Ser Gln Val
 165 170 175
 Thr Lys His Ala Phe Glu Ile Gly Lys Thr Val Ala Thr Thr Ala Gly
 180 185 190
 Ser Val Val Phe Arg Asn Glu Leu Leu Glu Leu Met Gln Tyr Lys Pro
 195 200 205
 Met Ser Glu Lys Gln Tyr Ala Lys Pro Leu Leu Ile Val Pro Pro Gln
 210 215 220
 Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Phe Asp Leu Ser Pro Gly Asn Ser Phe Val
 225 230 235 240
 Gln Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Leu Gln Val Phe Val Val Ser Trp Arg
 245 250 255
 Asn Pro Asp Val Arg His Arg Glu Trp Gly Leu Ser Ser Tyr Val Glu
 260 265 270
 Ala Leu Glu Glu Ala Leu Asn Val Cys Arg Ala Ile Thr Gly Ala Arg
 275 280 285
 Asp Val Asn Leu Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala
 290 295 300
 Leu Gln Gly His Leu Gln Ala Lys Arg Gln Leu Arg Arg Val Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Ser Tyr Leu Val Ser Leu Leu Asp Ser Gln Ile Asp Ser Pro Ala
 325 330 335
 Thr Leu Phe Ala Asp Glu Gln Thr Leu Glu Ala Ala Lys Arg His Ser
 340 345 350
 Tyr Gln Arg Gly Val Leu Glu Gly Arg Asp Met Ala Lys Ile Phe Ala

355	360	365
Trp Met Arg Pro Asn Asp Leu Ile Trp Asn Tyr Trp Val Asn Asn Tyr		
370	375	380
Leu Leu Gly Lys Glu Pro Pro Ala Phe Asp Ile Leu Tyr Trp Asn Ser		
385	390	395
Asp Asn Thr Arg Leu Pro Ala Ala Phe His Gly Asp Leu Leu Asp Phe		
405	410	415
Phe Lys His Asn Pro Leu Thr His Pro Gly Gly Leu Glu Val Cys Gly		
420	425	430
Thr Pro Ile Asp Leu Gln Lys Val Asn Val Asp Ser Phe Ser Val Ala		
435	440	445
Gly Ile Asn Asp His Ile Thr Pro Trp Asp Ala Val Tyr Arg Ser Thr		
450	455	460
Leu Leu Leu Gly Gly Asp Arg Arg Phe Val Leu Ser Asn Ser Gly His		
465	470	475
Ile Gln Ser Ile Leu Asn Pro Pro Ser Asn Pro Lys Ser Asn Tyr Ile		
485	490	495
Glu Asn Pro Lys Leu Ser Gly Asp Pro Arg Ala Trp Tyr Tyr Asp Gly		
500	505	510
Thr His Val Glu Gly Ser Trp Trp Pro Arg Trp Leu Ser Trp Ile Gln		
515	520	525
Glu Arg Ser Gly Thr Gln Arg Glu Thr Leu Met Ala Leu Gly Asn Gln		
530	535	540
Asn Tyr Pro Pro Met Glu Ala Ala Pro Gly Thr Tyr Val Arg Val Arg		
545	550	555
		560

<210> 5

<211> 1179

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1179)

<400> 5

atg act gac gtt gtc atc gta tcc gcc gcc cgc acc gcg gtc ggc aag	48
Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys	
1 5 10 15	
ttt ggc ggc tcg ctg gcc aag atc ccg gca ccg gaa ctg ggt gcc gtg	96
Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val	
20 25 30	
gtc atc aag gcc gcg ctg gag cgc gcc ggc gtc aag ccg gag cag gtg	144
Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val	
35 40 45	
agc gaa gtc atc atg ggc cag gtg ctg acc gcc ggt tcg ggc cag aac	192
Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn	
50 55 60	
ccc gca cgc cag gcc gcg atc aag gcc ggc ctg ccg gcg atg gtg ccg	240
Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro	
65 70 75 80	
gcc atg acc atc aac aag gtg tgc ggc tcg ggc ctg aag gcc gtg atg	288
Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met	
85 90 95	
ctg gcc gcc aac gcg atc atg gcg ggc gac gcc gag atc gtg gtg gcc	336
Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala	
100 105 110	
ggc ggc cag gaa aac atg agc gcc gcc ccg cac gtg ctg ccg ggc tcg	384

Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser	
115 120 125	
cgc gat ggt ttc cgc atg ggc gat gcc aag ctg gtc gac acc atg atc	432
Arg Asp Gly Phe Arg Met Gly Asp Ala Lys Leu Val Asp Thr Met Ile	
130 135 140	
gtc gac ggc ctg tgg gac gtg tac aac cag tac cac atg ggc atc acc	480
Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr	
145 150 155 160	
gcc gag aac gtg gcc aag gaa tac ggc atc aca cgc gag gcg cag gat	528
Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp	
165 170 175	
gag ttc gcc gtc ggc tcg cag aac aag gcc gaa gcc gcg cag aag gcc	576
Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala	
180 185 190	
ggc aag ttt gac gaa gag atc gtc ccg gtg ctg atc ccg cag cgc aag	624
Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys	
195 200 205	
ggc gac ccg gtg gcc ttc aag acc gac gag ttc gtg cgc cag ggc gcc	672
Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala	
210 215 220	
acg ctg gac agc atg tcc ggc ctc aag ccc gcc ttc gac aag gcc ggc	720
Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly	
225 230 235 240	
acg gtg acc gcg gcc aac gcc tcg ggc ctg aac gac ggc gcc gcc gcg	768
Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala	
245 250 255	
gtg gtg gtg atg tcg gcg gcc aag gcc aag gaa ctg ggc ctg acc ccg	816
Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro	
260 265 270	

ctg gcc acg atc aag agc tat gcc aac gcc ggt gtc gat ccc aag gtg	864
Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val	
275 280 285	
atg ggc atg ggc ccg gtg ccg gcc tcc aag cgc gcc ctg tcg cgc gcc	912
Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala	
290 295 300	
gag tgg acc ccg caa gac ctg gac ctg atg gag atc aac gag gcc ttt	960
Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe	
305 310 315 320	
gcc gcg cag gcg ctg gcg gtg cac cag cag atg ggc tgg gac acc tcc	1008
Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser	
325 330 335	
aag gtc aat gtg aac ggc ggc gcc atc gcc atc ggc cac ccg atc ggc	1056
Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly	
340 345 350	
gcg tcg ggc tgc cgt atc ctg gtg acg ctg ctg cac gag atg aag cgc	1104
Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg	
355 360 365	
cgt gac gcg aag aag ggc ctg gcc tcg ctg tgc atc ggc ggc ggc atg	1152
Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met	
370 375 380	
ggc gtg gcg ctg gca gtc gag cgc aaa	1179
Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys	
385 390	

<210> 6

<211> 393

<212> PRT

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 6

Met Thr Asp Val Val Ile Val Ser Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Lys			
1	5	10	15
Phe Gly Gly Ser Leu Ala Lys Ile Pro Ala Pro Glu Leu Gly Ala Val			
20	25	30	
Val Ile Lys Ala Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val Lys Pro Glu Gln Val			
35	40	45	
Ser Glu Val Ile Met Gly Gln Val Leu Thr Ala Gly Ser Gly Gln Asn			
50	55	60	
Pro Ala Arg Gln Ala Ala Ile Lys Ala Gly Leu Pro Ala Met Val Pro			
65	70	75	80
Ala Met Thr Ile Asn Lys Val Cys Gly Ser Gly Leu Lys Ala Val Met			
85	90	95	
Leu Ala Ala Asn Ala Ile Met Ala Gly Asp Ala Glu Ile Val Val Ala			
100	105	110	
Gly Gly Gln Glu Asn Met Ser Ala Ala Pro His Val Leu Pro Gly Ser			
115	120	125	
Arg Asp Gly Phe Arg Met Gly Asp Ala Lys Leu Val Asp Thr Met Ile			
130	135	140	
Val Asp Gly Leu Trp Asp Val Tyr Asn Gln Tyr His Met Gly Ile Thr			
145	150	155	160
Ala Glu Asn Val Ala Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Arg Glu Ala Gln Asp			
165	170	175	
Glu Phe Ala Val Gly Ser Gln Asn Lys Ala Glu Ala Ala Gln Lys Ala			
180	185	190	
Gly Lys Phe Asp Glu Glu Ile Val Pro Val Leu Ile Pro Gln Arg Lys			
195	200	205	
Gly Asp Pro Val Ala Phe Lys Thr Asp Glu Phe Val Arg Gln Gly Ala			

210	215	220
Thr Leu Asp Ser Met Ser Gly Leu Lys Pro Ala Phe Asp Lys Ala Gly		
225	230	235
Thr Val Thr Ala Ala Asn Ala Ser Gly Leu Asn Asp Gly Ala Ala Ala		240
	245	250
Val Val Val Met Ser Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Gly Leu Thr Pro		255
	260	265
Leu Ala Thr Ile Lys Ser Tyr Ala Asn Ala Gly Val Asp Pro Lys Val		270
	275	280
Met Gly Met Gly Pro Val Pro Ala Ser Lys Arg Ala Leu Ser Arg Ala		285
	290	295
Glu Trp Thr Pro Gln Asp Leu Asp Leu Met Glu Ile Asn Glu Ala Phe		300
305	310	315
Ala Ala Gln Ala Leu Ala Val His Gln Gln Met Gly Trp Asp Thr Ser		320
	325	330
Lys Val Asn Val Asn Gly Gly Ala Ile Ala Ile Gly His Pro Ile Gly		335
	340	345
Ala Ser Gly Cys Arg Ile Leu Val Thr Leu Leu His Glu Met Lys Arg		350
	355	360
Arg Asp Ala Lys Lys Gly Leu Ala Ser Leu Cys Ile Gly Gly Gly Met		365
	370	375
Gly Val Ala Leu Ala Val Glu Arg Lys		380
385	390	

<210> 7

<211> 738

<212> DNA

<213> Ralst nia eutropha

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(738)

<400> 7

atg act cag cgc att gcg tat gtg acc ggc ggc atg ggt ggt atc gga	48
Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly	
1 5 10 15	
acc gcc att tgc cag cgg ctg gcc aag gat ggc ttt cgt gtg gtg gcc	96
Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala	
20 25 30	
ggg tgc ggc ccc aac tcg ccg cgc cgc gaa aag tgg ctg gag cag cag	144
Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln	
35 40 45	
aag gcc ctg ggc ttc gat ttc att gcc tcg gaa ggc aat gtg gct gac	192
Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp	
50 55 60	
tgg gac tcg acc aag acc gca ttc gac aag gtc aag tcc gag gtc ggc	240
Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly	
65 70 75 80	
gag gtt gat gtg ctg atc aac aac gcc ggt atc acc cgc gac gtg gtg	288
Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val	
85 90 95	
ttc cgc aag atg acc cgc gcc gac tgg gat gcg gtg atc gac acc aac	336
Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn	
100 105 110	
ctg acc tcg ctg ttc aac gtc acc aag cag gtg atc gac ggc atg gcc	384
Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala	
115 120 125	

gac cgt ggc tgg ggc cgc atc gtc aac atc tcg tcg gtg aac ggg cag	432
Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln	
130 135 140	
aag ggc cag ttc ggc cag acc aac tac tcc acc gcc aag gcc ggc ctg	480
Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu	
145 150 155 160	
cat ggc ttc acc atg gca ctg gcg cag gaa gtg gcg acc aag ggc gtg	528
His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val	
165 170 175	
acc gtc aac acg gtc tct ccg ggc tat atc gcc acc gac atg gtc aag	576
Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys	
180 185 190	
gcg atc cgc cag gac gtg ctc gac aag atc gtc gcg acg atc ccg gtc	624
Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val	
195 200 205	
aag cgc ctg ggc ctg ccg gaa gag atc gcc tcg atc tgc gcc tgg ttg	672
Lys Arg Leu Gly Leu Pro Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu	
210 215 220	
tcg tcg gag gag tcc ggt ttc tcg acc ggc gcc gac ttc tcg ctc aac	720
Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn	
225 230 235 240	
ggc ggc ctg cat atg ggc	738
Gly Gly Leu His Met Gly	
245	

<210> 8

<211> 246

<212> PRT

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 8

Met Thr Gln Arg Ile Ala Tyr Val Thr Gly Gly Met Gly Gly Ile Gly
 1 5 10 15
 Thr Ala Ile Cys Gln Arg Leu Ala Lys Asp Gly Phe Arg Val Val Ala
 20 25 30
 Gly Cys Gly Pro Asn Ser Pro Arg Arg Glu Lys Trp Leu Glu Gln Gln
 35 40 45
 Lys Ala Leu Gly Phe Asp Phe Ile Ala Ser Glu Gly Asn Val Ala Asp
 50 55 60
 Trp Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe Asp Lys Val Lys Ser Glu Val Gly
 65 70 75 80
 Glu Val Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Val Val
 85 90 95
 Phe Arg Lys Met Thr Arg Ala Asp Trp Asp Ala Val Ile Asp Thr Asn
 100 105 110
 Leu Thr Ser Leu Phe Asn Val Thr Lys Gln Val Ile Asp Gly Met Ala
 115 120 125
 Asp Arg Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ser Ser Val Asn Gly Gln
 130 135 140
 Lys Gly Gln Phe Gly Gln Thr Asn Tyr Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu
 145 150 155 160
 His Gly Phe Thr Met Ala Leu Ala Gln Glu Val Ala Thr Lys Gly Val
 165 170 175
 Thr Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Tyr Ile Ala Thr Asp Met Val Lys
 180 185 190
 Ala Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Lys Ile Val Ala Thr Ile Pro Val
 195 200 205
 Lys Arg Leu Gly Leu Pr Glu Glu Ile Ala Ser Ile Cys Ala Trp Leu

210	215	220	
Ser Ser Glu Glu Ser Gly Phe Ser Thr Gly Ala Asp Phe Ser Leu Asn			
225	230	235	240
Gly Gly Leu His Met Gly			
	245		

<210> 9

<211> 542

<212> DNA

<213> *Pseudomonas* sp. strain 61-3

<400> 9

```

gaattcttgc gcgtgcactc tccttccgcc gaagtccagg gccacggcaa acctatcctg 60
caatttggca agatcggcgt aggcctgaac aaggtagaac cggccgggtca gtacgcactg 120
aaattgacct tcgacgacgg ccatgacagc ggcctgttca cctgggatta tctgtaccaa 180
ctggcacaac gtcaggaagc acittgggca gattatcttg cagaactcaa agcggctgga 240
aagtcccgcg acccaagcga atccatcgtc aagctgatgc tctaattcag gcctcttgct 300
ctttagaggg cattttctaa tticattgtt ttgaatgctc cgctgtgcgg caagcgattg 360
gcctgcttgc gaaaaaaatt aaactcgggt aaccaatgga gctggcaagt tccctgcagt 420
gctctctgaa ctagaaagca acgttgtgca attaacggtc acccgagcag tagtacctgg 480
cggttgctgt gtgactacac agctggtccc ggtactcgtc tcaggacaat ggagcgtcgt 540
ag

```

542

<210> 10

<211> 841

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 10

cccgggcaag taccttgccg acatctatgc gctggcgcg acgcgcctgg cgcgcgccgg 60
 ctgtaccgag gtctacggcg gcgacgcctg caccgtggcc gacgccggtc gcttctactc 120
 ctatcggcgc gatggcgtga ccggccgcat ggccagcctg gtctggctgg cggactgagc 180
 ccgccgtgc ctcactcgtc cttgccccctg gccgcctgcg cgcgctcggc ttcagccttg 240
 cgtcggcggc ggccgggCGT gccatgatg tagagcacca cgccaccggc gccatgccat 300
 acatcaggaa ggtggcaacg cctgccacca cgttgtgctc ggtgatcgcc atcatcagcg 360
 ccacgtagag ccagccaatg gccacgatgt acatcaaaaa ttcattcctt tcgcctatgc 420
 tctggggcct cggcagatgc gagcgctgca taccgtccgg taggtcggga agcgtgcagt 480
 gccgaggcgg attcccgcct tgacagcgcg tgcgttgcaa ggcaacaatg gactcaaatg 540
 tctcggaatc gctgacgatt cccaggtttc tccggcaagc atagcgcatg gcgtctccat 600
 gcgagaatgt cgcgcttgcc ggataaaagg ggagccgcta tcggaatgga cgcaagccac 660
 ggccgcagca ggtgcggctg agggcttcca gccagttcca gggcagatgt gccggcagac 720
 cctcccgtt tgggggaggc gcaagccggg tccattcgga tagcatctcc ccatgcaaag 780
 tgccggccag ggcaatgccc ggagccggtt cgaatagtga cggcagagag acaatcaaat 840
 c 841

<210> 11

<211> 292

<212> DNA

<213> *Ralstonia eutropha*

<400> 11

ccigccggcc tggttcaacc agtcggcagc cggcgctggc gcccgcgtat tgcggtgcag 60
 ccagcgcggc gcacaaggcg gcgggcgttt cgtttcgccg cccgtttcgc gggccgtcaa 120
 ggcccgcgaa tcgtttctgc ccgcgcggca ttctctgctt tttgcgcaa ttcaccgggt 180
 tttccttaag ccccgctcgt tttcttagtg ccttggtggg catagaatca gggcagcggc 240
 gcagccagca ccatgttcgt gcagcgcggc cctcgcgggg gcgaggctgc ag 292

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ポリエステル生成経路を示した図である。

【図 2】

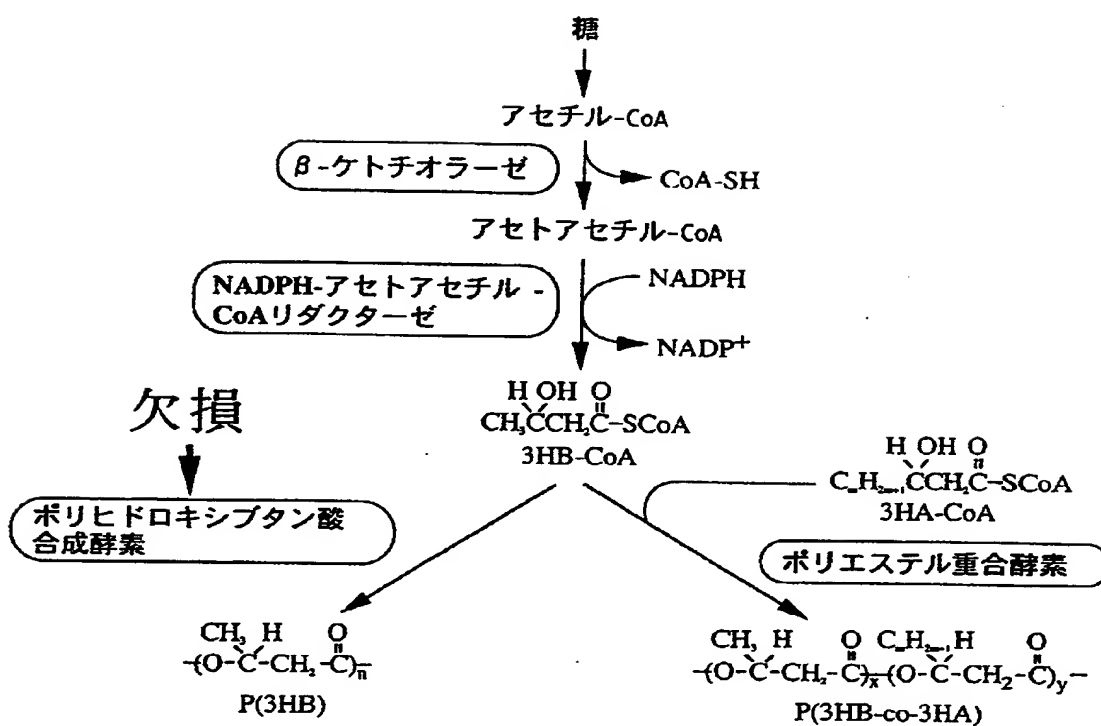
組換えベクターの構築手順を示した図である。

【図 3】

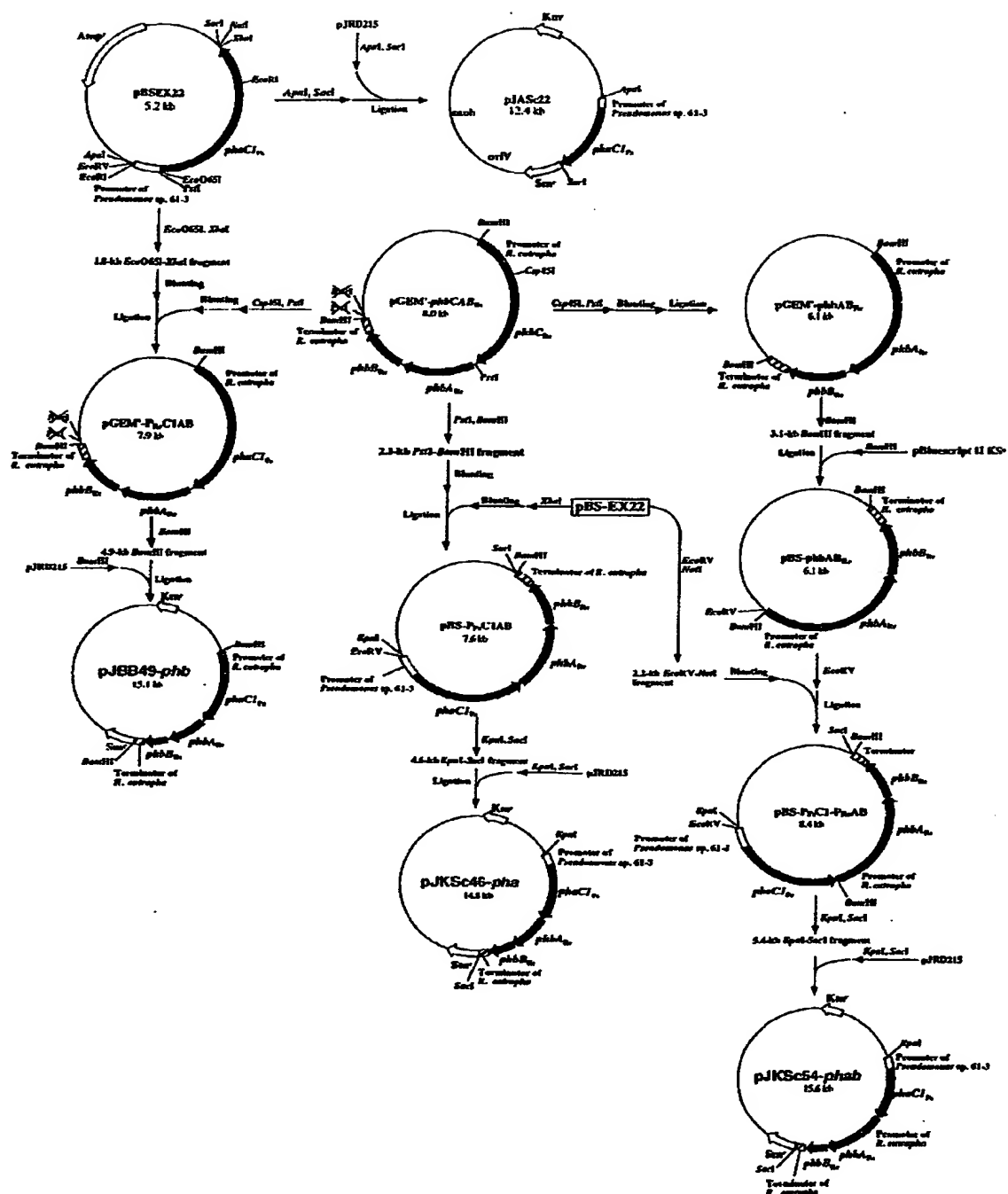
シュードモナス・エスピー61-3株 (phbC::tet) の形質転換に用いた組換えベクターの構造を示した図である。

【書類名】 図面

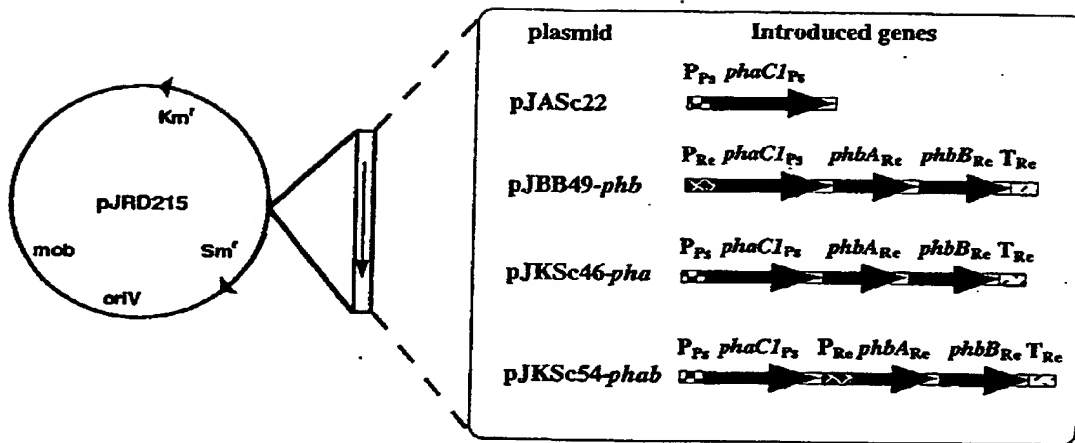
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 共重合ポリエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 ポリエステル重合酵素遺伝子、 β -ケトチオラーゼ遺伝子及びNADPH-アセトアセチルCoAレダクターゼ遺伝子を含有する組換えベクターを含む、ポリヒドロキシブタン酸合成酵素遺伝子が破壊された形質転換体。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 7 9 2]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 8 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
氏 名	理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

